

抗生物質 Antimycin に関する研究第一報

アンチマイシン酸の合成的研究 (その1)*

奥 村 重 雄

Synthesis of Antimycic acid

Shigeo OKUMURA

The synthesis of N-(3-aminosalicyloyl)-dl- threonine, antimycic acid, one of hydrolytic products of antibiotic antimycin A has been achieved from salicylic acid. But the chemical behavior of the resulting product was not completely identical with that of antimycic acid.

緒 言:

かつて A. Fleming が黄色ブドウ状菌の平板培地に混入した *Penicillium* からペニシリンを発見した故事そのままに, 1945 年 ウィスコンシン大学 病理学教室の Leben 博士はリンゴクロボ病菌 (*Apple scab*) の繁殖が *Venturia actinomyces* 菌の混入により阻止される¹⁾ことを見出し, 同大学生化学教室 Strong 博士の協力を得て1949年この種属不明の *Actinomyces* の純粋培地より新抗生物質を結晶状に分離して Antimycin A, $C_{28}H_{40}O_9N_2$ 融点 $126\sim128.5^\circ$ と命名した²⁾。

ところが1956年協和醸酵株式会社東京研究所の原田博士³⁾らは東京都渋谷区東北沢の土壌から分離した一新放線菌 *Streptomyces kitazwanensis* Nov. sp. より一新抗イネ熱病菌抗生物質を発見してアンチピリクリン A と命名したが, その後 Antimycin A に一致することが判明した。

さらに1957年東京大学応用微生物研究所の米原博士⁴⁾らは新抗生物質 Blastomycin を分離し, Antimycin と異なるものとされた。

その後原田博士 (1958) はクロロホルムメタノール—水—溶媒による向流分配法(30本式)により Antimycin A の精製分離を試み Antimycin A は少くとも4種の混合物より成ることを見出し且つ A_1 及び A_2 に一致するフラクションの分離に成功し, A_3 は米原博士らの Blastomycin に融点分子式及び R_f 値とともに酷似するも赤外線吸収の相違点から異なるものとされた (第1

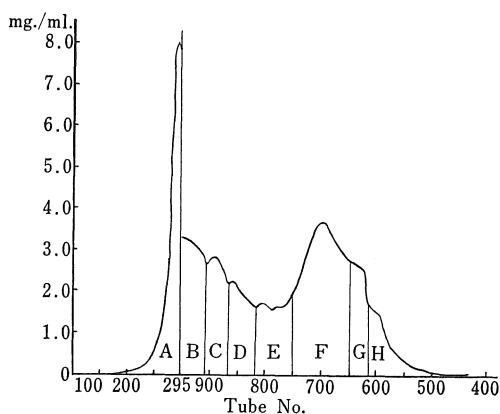
表)。

第 1 表

物質名	融 点	分子式	R_f
Antimycin A	$138\sim139^\circ C$	$C_{27}H_{38}N_2O_9$	
〃 A_1	$147\sim148^\circ C$	$C_{27}H_{40}N_2O_9$	$0.3\sim0.35$
〃 A_2	$167\sim168^\circ C$	$C_{26}H_{36}N_2O_9$	$0.58\sim0.61$
Blastomycin	$168^\circ C$	$C_{26}H_{36}N_2O_9$	$0.60\sim0.62$

6) 奥村も同一溶媒系を用いて分配向流法 (300 本式) により A_1 , A_2 及び A_3 に該当するフラクションの分離に成功した (第1図, 第2図)。

然し最近に至り米原博士の Blastomycin は Antimycin A_3 に一致することが確認され, さらに Antimycin A_1 , A_2 , 及び A_3 の化学構造が殆んど確定される段階に立ち至った。



第 1 図

* 本研究の一部は名古屋大学にて開かれた天然有機化合物構造討論会に於て発表した,

分画	Rf	Potency	アンチマイシン
A	0.32	220	A ₁
B	0.32	220	A ₁
C	0.32, 0.42	260	A ₁ + A ₂
D	0.33, 0.45	380	A ₁ + A ₂
E	0.45, 0.58	1000	A ₂ + A ₃
F	0.58	2670	A ₃
G	0.58	2880	A ₃
H	0.57, 0.66	3040	A ₃ + A ₄

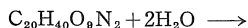
第 2 図

Antimycin の化学構造

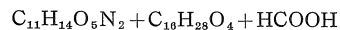
A) Antimycin の分解反応⁷⁾

Antimycin がアルカリに比較的不安定なことより 5% 苛性ソーダで分解反応を試み、それが Antimycin の化学構造決定の重大な鍵を与えた。

すなわち 5% 苛性ソーダ水溶液と室温で約 5 分間接触させることにより、比較的好収率で $C_{11}H_{14}O_5N_2$ に一致する酸性物質と $C_{10}H_{20}O_4$ なる組成の中性物質を生成する。



Antimycin A



Antimycic Acid 中性物質

酸性物質はアンチマイシン酸 Antimycic Acid と命名された。

B) Antimycic Acid の化学構造

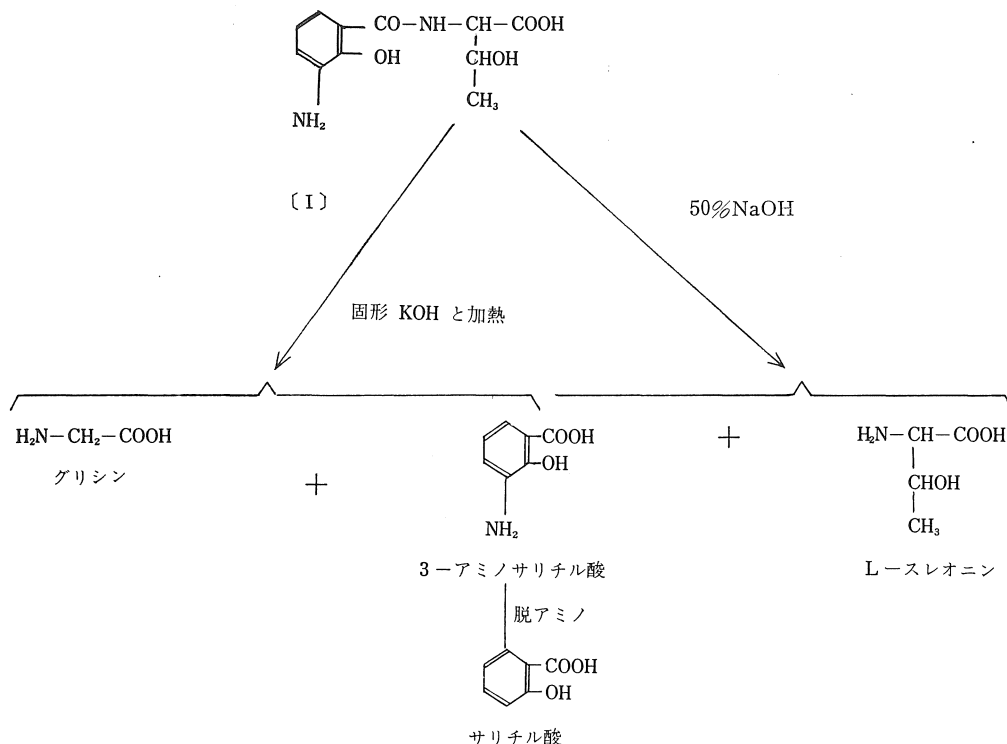
Antimycic Acid は夫々 1 ケ宛のアミノ基—NH₂、フェノール基—OH 及びカルボキシル基—COOH を含む両性物質で

イ) 50% 苛性ソーダと加熱すれば L—スレオニンと O—アミノサリチル酸を与える。

ロ) 固形苛性ソーダと加熱すれば、グリシンと O—アミノサリチル酸を生ずる。

ハ) 一般にアシルスレオニン Acylthreonine は強アルカリによりグリシンに変化することはよく知られている。

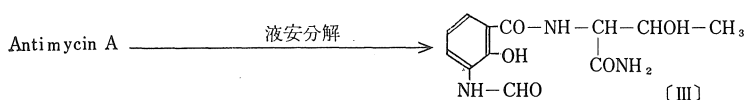
これらの事実から (第 3 図) Antimycic Acid はその化学構造として 3—Aminosalicilyloyl-L-threonine [I] と推定された。



第 3 図

尚アンチマイシンのアルカリ性加水分解により蟻酸が遊離されることから 3—アミノサリチル酸のアミノ基はホルミル化されているもの〔Ⅲ〕と推定されるが、奥村は⁶⁾

アンチマイシン A の液安分解により融点 186~187°C の針状結晶として N—Formyl-antimycic acid amide〔Ⅲ〕の分離に成功してこの予想の正しいことを立証した。

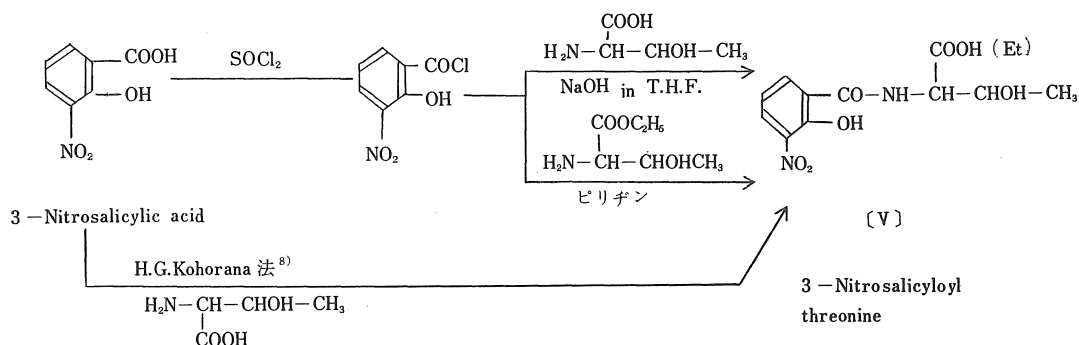


C) Antimycin Acid の合成

イ) 3-ニトロサリチル酸〔IV〕より出発する方法

3-ニトロサリチロイルスレオニン〔V〕を合成し、次いでこれを還元してアンチマイシン酸に到達する目的

で、次に示す如く 3 ニトロサリチル酸とスレオニンの縮合反応を試みたが、意外にも縮合反応は生起せず原料の回収に終った。

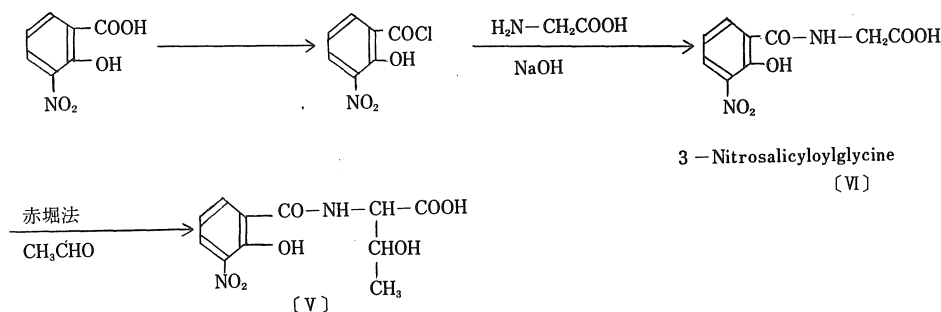


即ち 3-ニトロサリチル酸 (M.P. 143~144°C⁹⁾) を塩化チオニルによって酸塩化物とし、その無水テトラヒドロフラン溶液を dl-スレオニンの苛性ソーダ水溶液中に滴下して縮合を試みたが 3-ニトロサリチル酸を回収するのみであった。

またピリジン又はトリエチルアミン中で dl スレオニンエステルを縮合させたが、同じく原料回収に止った。

次いで H. G. Khorana⁸⁾ 法による Dicyclohexyl carbodiimide による縮合反応に期待をかけたが依然として目的を到達することができなかった。

このように 3-ニトロサリチル酸はスレオニンと peptide を生成し難いので、吾々は第 2 の可能な方法としてグリシンと縮合後赤堀法を適用してグリシン基をスレオニン基に変化して目的物〔V〕に到達せんと企てた。



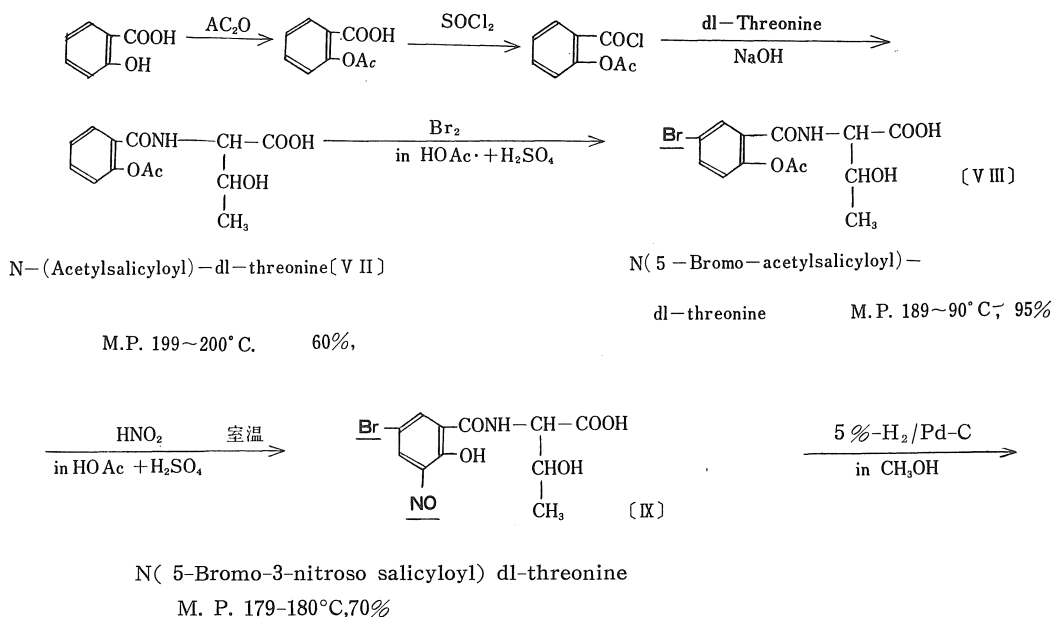
即ちスレオニンの場合と同様に 3 ニトロサリチロイルクロリドの無水テトラヒドロフラン溶液をグリシンの苛性ソーダ溶液中に滴下したところ、首尾よく縮合が行われて目的とする N-(3-nitrosalicyloyl) glycine〔VI〕 (M.P. 143~144°C) を収率 29.2% に得られた (N 分析値 11.74%, 計算値 11.66%)¹⁰⁾*。次いで赤堀のスレオニン合

成法に従って〔VI〕を硫酸銅で銅塩に変化後アセトアルデヒドを反応させて一挙に目的を達成せんとしたが、原料を回収するのみで依然として成功を見るに至らなかった。

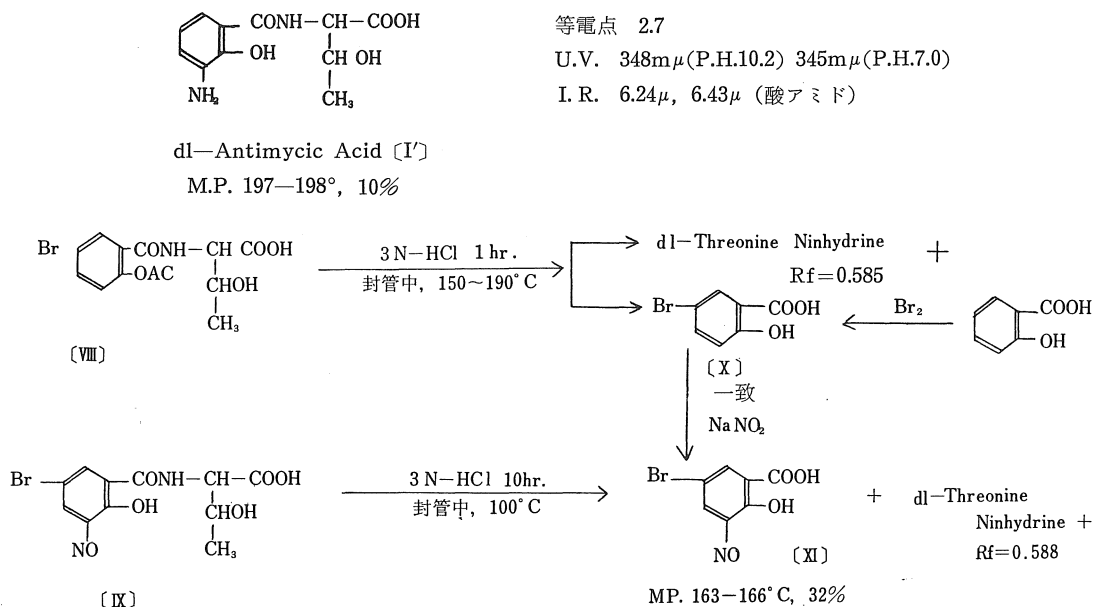
ロ) サリチル酸より出発する方法

最も可能性のある方法としてサリチル酸にスレオニンを作用して先ずペプチド結合をつくり、次いでニトロ基を導入して目的物〔V〕に到達する方法を検討した (第 4 図)。

* ピリジン存在下にグリシンエチルエステルを作用するときは N-(3-ニトロサリチロイル) グリシンエチルエステルが 74.2% で得られる。M.p. 95~97°C, N 分析値: 10.53%, 計算値 10.45%



第4図



第5図 中間体の化学構造確認

¹¹⁾
 先ずアセチルサリチル酸より J.M. Connan 法に従って酸塩化物 B.P. 125~126.5°C(15mm) を合成し常法により dl-スレオニン を苛性ソーダ存在下に結合させ N-(Acetylsaliyloyl)-dl-threonine [VII] を最高収率60%にて合成することができた。M.P. 199~200°C, N 分析値5.14%, 計算値 4.98%, F₂Cl₃ 試験陰性で重炭酸ソー

ダ水溶液に可溶であってペプチド結合生成を示す。

次いで氷酢酸中硫酸の存在下に臭素を作用させ N-(5-Bromoacetylsalicycoyl) de-threonine [VIII] を95%収率にて得た。M.P. 189~190°C, N 分析値3.90% (計算値 3.98%) Br 分析値22.40% (計算値 22.19%) F₂Cl₃ 試験陰性で重炭酸ソーダ水溶液に可溶である。次にこの

ものの構造を確認する目的で (第5図) 3N-塩酸とともに封管中 150~190°C に1時間加熱加水分解すると 5-Bromosalicylic acid [X] M.P. 160~164°C を64%収率にて得られた。Hewitt¹²⁾ に従ってサリチル酸のブrom化により作製したもの (M.P. 164~160°C) と混融して融点の降下を示さない。一方加水分解物中のアミノ酸分はニンヒドリン反応陽性で、その一次元ペーパークロマトグラフィ (フェノール 40.4, 水 20.5, 蟻酸 1) による R_f値は0.585で標準 dl-スレオニンの R_f値及び文献値¹³⁾ に一致する。これらの事より5位がブrom化されたことが判る。

次に [VIII] を80%沸騰酢酸中濃硫酸を以てニトロ化を試みたが成功せず原料を回収するのみであった。よって吾々は亜硝酸によるニトロソ化を試みた。即ち [VIII] を室温で氷酢酸中硫酸の存在下に亜硝酸を作用させ目的とするニトロソ体、N-(5-Bromo-3-nitroso-salicyloyl)-dl-threonine [IX] を70%収率で得ることが出来た。M.P. 179~180°C, FeCl₃ 反応陽性で結晶水を有している。その結晶水の模様は次のようである。

- イ) 水より再結晶すると3分子の結晶水を含み
N分析値 7.02% (計算値 6.98%)
- ロ) これを 80~85°C 2時間 (真空) 乾燥すると1分子の水を失って結晶水2分子となり
乾燥減量 4.6% (計算値 4.5%)
N分析値 7.27% (計算値 7.31%)
- ハ) メタノール又はエタノールより再結晶すると結晶水2分子を含み
N分析値 7.55% (計算値 7.31%)
- ニ) これを 95~100°C で2時間 (真空) 乾燥すると結晶水を完全に失って
乾燥減量 10.4% (計算値 9.4%)
N分析値 8.28% (計算値 8.08%)

[IX] は重炭酸ソーダ水に可溶で、これを3-N-塩酸と封管中に100°Cに10時間加熱加水分解し (第5図) 5-Bromo-3-nitrososalicylic acid [XII] を32%収率で得

た。 (M.P. 163~160°C)。このものは5-Bromosalicylic acid [X] を氷醋 (硫酸) 中亜硝酸ソーダによるニトロソ化にて得たもの (M.P. 168~170°C) と混融して融点降下なく、またその N 分析値 (5.88%) は計算値 (5.69%) によく一致する。加水分解物中のアミノ酸分はニンヒドリン反応陽性で R_f値は0.588で標準 dl-スレオニンの R_f値と一致する。従って吾々の得た N-(5-Bromo-3-nitrososalicyloyl) dl-threonine は吾々の予期する構造を有しているものと考えられる。

最後にこのもの [IX] を5%Pd/Cにてメタノール中で接触還元を行うと脱ブromと同時にニトロソ基が還元されて目的とする dl-アンチマイシン酸; N-(3-Amino-salicyloyl) dl-threonine [I'] に遂に到達することに成功した。M.P. 197~198°C (分解) で結晶水を有する。

分析値:

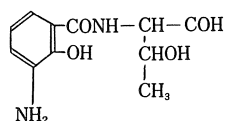
$\frac{1}{2}$ 分子の結晶水を含むものとして,

	実 測 値			計算値
C %	50.49,	50.43		50.25
H %	5.91,	6.01		6.10
N %	10.58,	10.53, 10.73		10.65

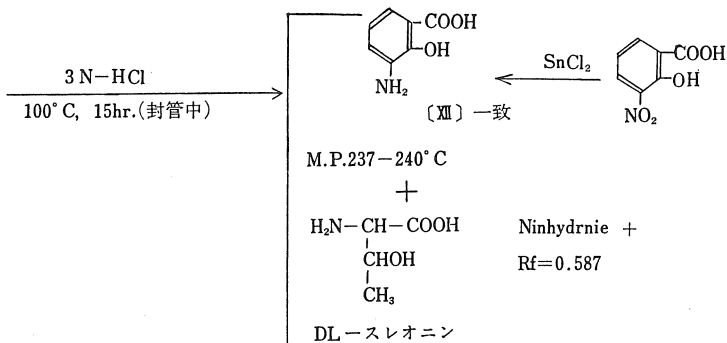
このものは100°Cに、2~3時間、乾燥すると真空下に於ても完全に分解するが50°Cでは真空乾燥 (2時間) でも分解は無く結晶水も失わない。

このものは両性を示し、等電点は約2.7附近にあり、赤外吸収スペクトルはアミド吸収として6.24μ, 6.43μに2本の吸収が認められた。

またこのものを3N-塩酸と100°Cに15時間封管中で加熱すると少量の3-アミノサリチル酸¹⁴⁾ [XII] が得られる。M.P. 237~240°C (分解) Zahn 法により3ニトロサリチル酸の第一塩化錫還元によって得たもの (M.P. 234~236°C) と混融しても融点の降下は認められない。また加水分解物中のアミノ酸分はニンヒドリン反応陽性で、R_f値も0.587で標準アミノ酸の R_f値とよく一致し文献値とも一致している。



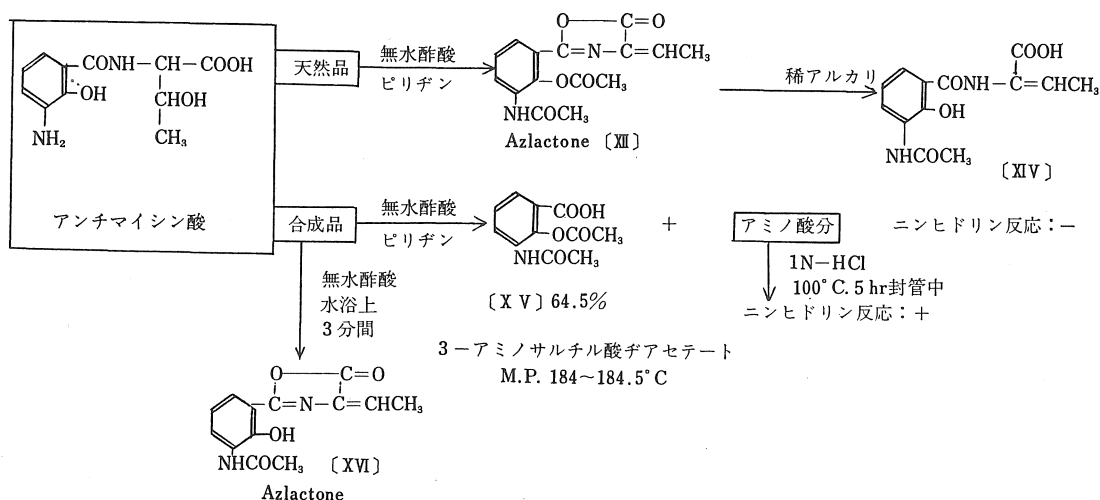
[I] 合成 dl-アンチマイシン酸



D) 天然アンチマイシン酸との比較検討

以上述べた実験的事実よりして吾々の合成したアンチマイシン酸は所期の化学構造を有するものと考えられる。

然るに吾々は次に述べる反応に於て意外にも天然アンチマイシン酸との間に重要な相違点を見出した(第6図)。



第 6 図

13)
即ち Strong に従ってピリジンの存在下に無水酢酸を以てアセチル化を行うに、天然アンチマイシン酸に於てはアズラクトン化が起って bisanhydrodiacetate M. P. 202~202.5°C [XIII] を生成するに反して、合成アンチマイシン酸にあってはアズラクトンの生成は見られず融点184~184.5°Cの結晶が得られる。F₆Cl₃ 試験陰性、重炭酸ソーダ水溶液に可溶、稀塩酸に不溶である。N分析値 5.91% (計算値 6.14%) でアミノサリチル酸のDiacetate [XII] に一致した。尚分解時に得られるアミノ酸分はニンヒドリン反応陰性であるが、封管中 1NHCl と5時間、100°Cに加熱するとニンヒドリン反応陽性に変化する。

然しながら合成アンチマイシン酸を無水酢酸単独と水浴上3分間加熱するとアズラクトン化が起って2-(3'-Acetamido-4'-hydroxyphenyl)-4-ethyliden-oxazolone [XVI] が収率29.4%で得られた*。融点252~253°C, N分析値 10.99% (計算値10.76%) でF₆Cl₃ 試験陽性で青緑色を呈し、ニンヒドリン反応陰性、稀塩酸不溶である。

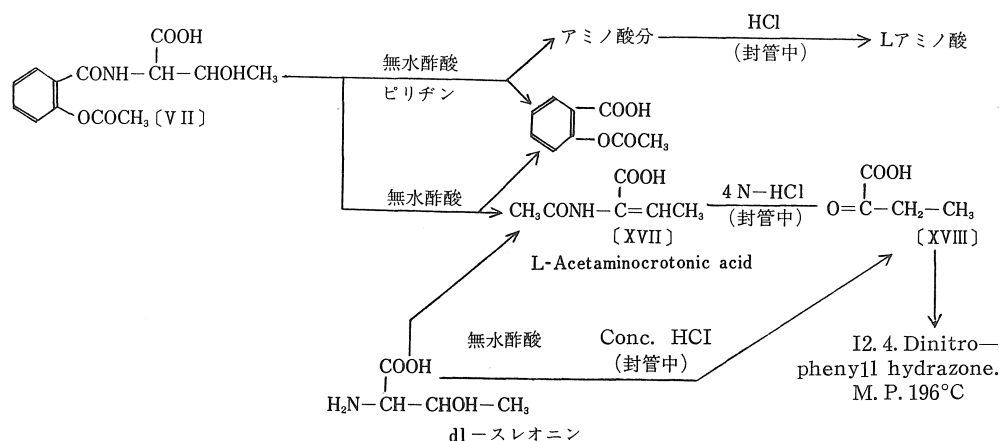
以上の如く合成アンチマイシン酸の無水酢酸または無水酢酸ピリジンに対する態度が天然品と異なることから合成品〔VII, VIII, IX及びI〕はペプチドではなくエステルではないか?とも考えられるが、これらは(i)常圧では塩酸による加水分解困難であり、(ii)ニンヒドリン

反応陰性であり、(iii)〔VII〕, 〔VIII〕, 〔IX〕が塩酸に不溶で塩基性を示さないこと等はエステル結合の存在を否定するものである。また赤外吸収スペクトルに於ては〔VII〕 6.35, 6.41μ〔VIII〕 6.23, 6.47μ, 〔IX〕 6.24mμ, 6.43μに酸アミド結合による吸収が認められる。さらに前述の如くN-(5-Bnomosalicyloyl)-dl-threonine [VIII] が沸騰酢酸中濃硫酸によりニトロ化を受けずに原料を回収して分解を受けない事実もエステル結合の存在を否定するものである。

また合成アンチマイシン酸が無水酢酸単独にてアズラクトン化して〔XVI〕を与えることはペプチド結合であることを支持する。

以上のことよりこの種ペプチド結合の無水酢酸に対する作用は従来にない特異的なものであると考えられるのでN-(Acetylsalicyloyl) dl-threonine [VII] についても無水酢酸(ピリジン)の反応を試みたところアズラクトン化は起らず52%収率でM.P. 137~138.5°Cのアセチルサリチル酸を捕捉した。また分解物中のアミノ酸分はニンヒドリン反応は陰性であったが、1N-HClと封管中100°Cで1時間加熱することによりニンヒドリン反応陽性に転化する。また無水酢酸単独と110~120°Cに2~3分加熱すると89%収率でM.P. 138~139°Cのアセチルサリチル酸(混融により確認)と66%収率でα-アセトアミノクロトン酸〔XVII〕 M.P. 160~160.5°Cが得られた。N分析値は9.98%で理論値9.79%に一致しニンヒドリン反応は陰性である。このものはdl-スレオニンに無水酢酸を作用しても得られ(66%収率), Price 等に

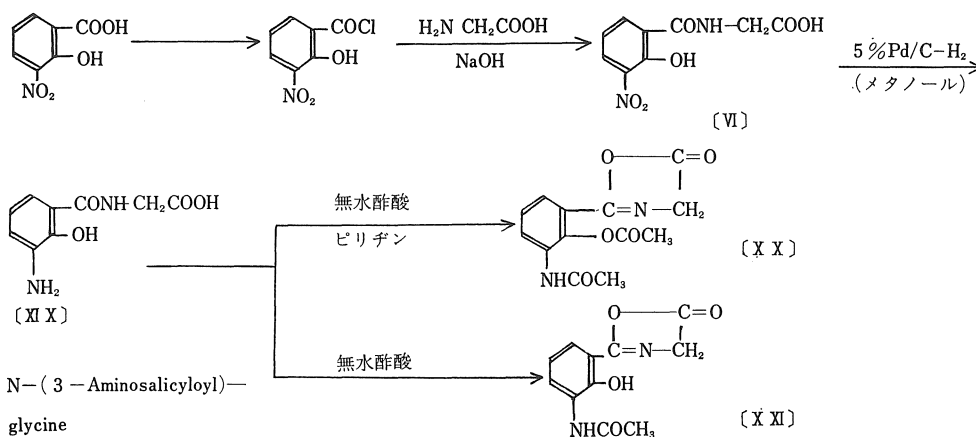
* 天然アンチマイシン酸ではかかることは認められてない。



より α -N-クロルアセチルアミノ酪酸に無水酢酸を作用して得られたもの〔XVII〕に一致する。このものの構造をさらに確認する目的で4N-HClと120°Cに封管中2時間加熱すれば α ケト酪酸〔XVIII〕となり、その2,4-Dinitrophenyl hydrazone は M.P. 195—196°C で、その分析値 20.00% は計算値 19.86% によく一致して居り、また Wieland 法に従ってスレオニンを濃塩酸と160°Cに1時間封管中加熱して得られる α ケト酪酸の2,4-Dinitrophenyl hydrazone (M.P. 196°C) と混融しても融点の降下を示さない。

これらの事実から N-(Acetyl salicyloyl)-dl-threonine のペプチド結合は無水酢酸又は無水酢酸ピリジンにより切断されることが確認された。従って合成アンチマイシン (I') のペプチド結合切断の際のアミノ酸分はアセトアミノクロトン酸〔XVII〕であると推定される。

扱てこの種のペプチド結合の切断は従来の文献に記載の無い新しい分解型式と考えられるが故に吾々は更に確認する目的で3-アミノサリチロイルグリシン〔XIX〕の無水酢酸分解の検討を試みた。



即ち先に得た N-(3-Nitrosalicyloyl)-glycine〔VI〕をメタノール中で5%pd-Cにて接触還元すれば71%収率で3-アミノサリチロイルグリシンが得られる。M.P. 211—212°CでN分析値13.28% (計算値13.39%)でFeCl₃反応陽性で赤色に呈色する。

これをピリジン中で無水酢酸を作用させると収率21%でM.P. 203—204°Cの2-(3'-Amino salicyloyl)-oxazolone-diacetate〔XX〕が得られた。このもののN分析値は10.30%で計算値(10.15%)に一致し、FeCl₃試験は陰性で稀塩酸は不溶である。一方無水酢酸単独で

は収率51.2%で2-(3' Acetaminosalicyloyl)-oxazolone〔XXI〕を生成する。M.P.183—184°CでN分析値12.07% (計算値11.96%)である。FeCl₃試験陽性で紫色を呈する。

即ちスレオニンに代るグリシンの結合したペプチド〔XIX〕では〔VII〕,〔VIII〕,〔IX〕及び〔I'〕の場合のような分解を起さないでアズラクトンに変化する。

また合成アンチマイシン酸〔I'〕らのペプチド結合の切断が容易に行われることよりしてニトロソ体〔IX〕のPd還元によるアンチマイシン酸〔I'〕生成の際に著量の

N含量の低い不安定物質 (N含量 8~9%) の生成を行うことは、この際還元分解を行っているものと推定される。

尚アロ体即ち N(salicyloyl)-allothreonine にも無水酢酸 (ピリジン) または無水醋酸の作用を試み、同様な切断分解を認めた。

以上述べたように吾々の合成し得たアンチマイシン酸 [I'] を所期の化学構造を有するものと考えられるにもかかわらず無水酢酸* に対する作用の点で一致を見なかった。天然アンチマイシン酸の推定構造式に疑点を持つべきか? これらについては今後の研究に俟ちたい。

追記

- 1) 吾々の合成アンチマイシン酸及び天然アンチマイシン酸の紫外部及び赤外部吸収スペクトルに於ける吸収はほぼ一致するも完全な一致を見ない。
- 2) 合成アンチマイシン酸の天然アンチマイシン酸との不一致に関してはその後吾々はある種の見解を得た。この見解に沿って実験を続行し近く興味ある新しい知見が得られるものと期待している。
- 3) 吾々はその後天然アンチマイシン酸の合成に成功することが出来た。

文 献

- 1) Lebon, Keitt : Phyto pathol., **38** 899 (1948)
- 2) F.M. Strong et al : J. Am. Chem. Soc., **71** 2436 (1949)
- 3) 中山, 岡本, 原田 : J. Antibiotics Japan., **A 9** 63 (1956)
- 4) 米原その他 : 同上 **A 10** 39 (1957)
- 5) 原田その他 : 同上 **A 11** 32 (1958)
- 6) 奥村 : 核酸, 蛋白, 酵素, **5** 11 (1959)
- 7) F.M. Strong, Vam Tammelen, Tenner : J. Amer. Chem. Soc., **75** 3623 (1953)
- 8) Chem. Rev., **53** 145 (1953)
- 9) J, Chem. Soc., **85** 1228 (1902)
- 10) 赤堀四郎, 日本化学会第10年会 (1957)
Mc. Roberlock, J. Amer. Chem. Soc., **71** 2458 2463 2469 (1949)
- 11) J. Chem. Soc., **89** 1318 (1906)
- 12) J.T. Hewitt : 同上 **85** 1228 (1902)
- 13) F.M. Strong et al : J. Amer. Chem. Soc. **75** 1100 3623 (1953)
- 14) O. Zahn ; J. Prakt. Chem. (2) **61** 532
- 15) V.E. Price. J.P. Greenstein Arch. Biochem. **18** 383 (1948)
- 16) T.H. Wieland : Angew. Chem. **67** 399 (1955)

* F.M. Strong 等は天然アンチマイシン酸に無水酢酸—ピリジンの作用によってアズラクトン体を得ているが吾々は無水酢酸の単独作用にてアズラクトン体を得た。